

**ВПЛИВ ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ 3
ЦИТОСТАТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ НА СТАН
СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОВСТОЇ КИШКИ
ЩУРІВ ЗА УМОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ**

М.П. Гебура, І.В. Харчук, Т.В. Рибальченко

Київський національний університет ім.Тараса Шевченка

Вступ

Процеси вільнорадикального окислення протікають в тканинах організму як у нормі, так і при патології. Порушення окислотно-антиоксидантної рівноваги внаслідок дії різних чинників призводить до оксидативного стресу. Онкологічні захворювання часто характеризуються підвищеним рівнем концентрації вільних радикалів, що негативно впливає на перебіг хвороби. При канцерогенезі оксидативний стрес має особливе значення, оскільки може бути як причиною, так і наслідком злоякісних перетворень [11]. Тому важливими є дослідження дії цитостатичних препаратів на фоні оксидативного стресу як супутнього стану канцерогенезу. Ведеться пошук речовин, що прицільно пригнічували б ріст злоякісних клітин та мали антиоксидантні властивості. Новосинтезована сполука похідне малеїмиду 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(СF3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон (МІ-1) є селективним інгібітором низки тирозинових протеїназ, яким належить провідна роль у процесах проліферації і росту клітин в умовах канцерогенезу [12]. In vitro МІ-1 виявляє цитостатичну активність на культурах злоякісних клітин (особливо на клітинах раку товстого кишечника) [1], і чинить незначний вплив на нормальні клітинні культури [13] та органи щурів [5-7, 9]. Після інтрагастрального десятиденного чи одноразового введення МІ-1 не впливає на процеси перекисного окислення ліпідів та ензимів у клітинах печінки та не викликає порушення окислотно-антиоксидантної системи [10]. Крім того, МІ-1 має антиоксидантні властивості при

інтоксикації хлоридом кобальту, частково попереджуючи оксидативний стрес на клітини печінки [3], нирок [8] і сім'яників [4] щурів, що, ймовірно, зумовлене його властивостями утилізувати вільні кисневі радикали [10].

Метою нашої роботи стало дослідження структурно-функціонального стану слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом МІ-1 за умов оксидативного стресу.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені на 24 білих щурах-самцях масою 180-200 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні при нормальному світловому дні. Оксидативний стрес моделювали шляхом внутрішньочеревинних ін'єкцій тваринам 0,1 мл хлориду кобальту ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), розчиненого у 0,09%-ному NaCl, в дозі 15 мг/кг протягом 10 днів [2]. МІ-1 вводили щурам інтрагастрально в 0,1 мл олії щодня у дозі 5 мг/кг, що становить 1/100 LD₅₀ [2]. Контрольна група тварин отримувала 0,1 мл олії інтрагастрально та 0,1 мл фізіологічного розчину внутрішньочеревинно.

Для морфологічних досліджень проводили стандартну гістологічну обробку товстої кишки. Зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном Б'ємера з дофарбовуванням еозином та оранжем G. Стан слизової оболонки оцінювали після мікроскопічних та морфометричних досліджень, які проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-41 та програми Image J. У слизовій оболонці товстої кишки вимірювали товщину слизового шару та глибину крип. З метою оцінки функціональної активності епітелію вимірювали висоту клітин з посмуговою облямівкою (надалі епітеліоцити) та площу поперечного перерізу їх ядер, а також площу келихоподібних клітин. Мітотичний індекс, який свідчить про активність проліферації клітин епітелію, виражали у відсотках. Статистичну обробку проводили з використанням t-критерію Ст'юдента.

Отримані результати та їх обговорення

У контролі слизова оболонка товстої кишки щурів має типову будову, всі морфометричні показники контрольної групи представлені на рисунках 1, 2.

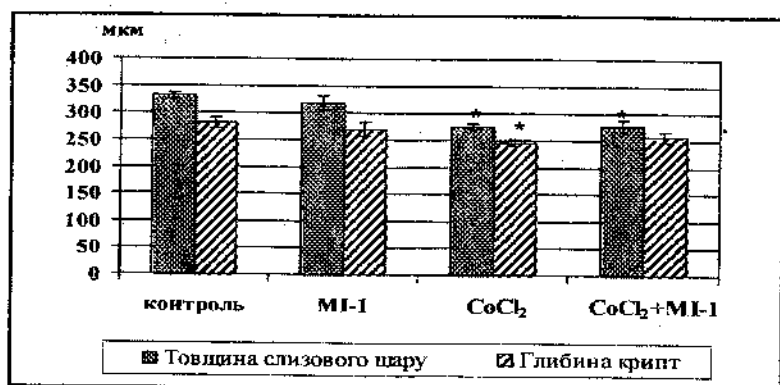


Рис. 1. Товщина слизового шару та глибина крипт слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом MI-1, CoCl₂ та їх сумісної дії (* позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при $p < 0,05$).

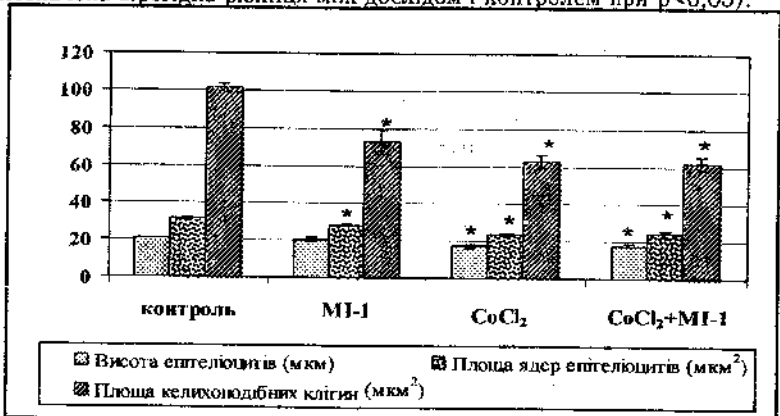


Рис. 2. Висота епітеліоцитів, площа ядер епітеліоцитів і келихоподібних клітин слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом MI-1, CoCl₂ та їх сумісної дії (* позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при $p < 0,05$).

MI-1 не викликає суттєвих морфо-функціональних змін у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Товщина слизової оболонки та глибина кишкових крипт вірогідно не змінюються (рис. 1). Водночас MI-1 викликає незначне функціональне напруження клітин епітелію слизової оболонки товстої кишки. Про це свідчить зменшення площі ядер епітеліоцитів на 11%, хоча їх висота змінюється не суттєво (рис. 2). Клітини

дещо стають тоншими, а їх ядра займають чітко базальне положення. Площа келихоподібних клітин вірогідно зменшується на 28%, також зменшується їх кількість. Судини помірно наповнені кров'ю. Мітотичний індекс залишається близьким до контрольних значень (рис. 3).

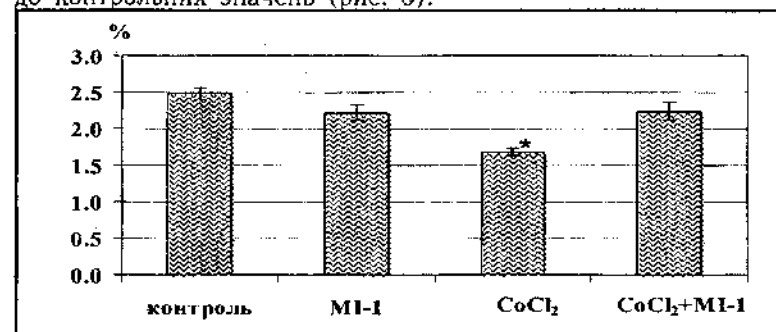


Рис. 3. Мітотичний індекс епітелію товстої кишки щурів під впливом MI-1, CoCl₂ та їх сумісної дії (* позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при $p < 0,05$).

Оксидативний стрес, спричинений хлоридом кобальту, викликає значне порушення структури слизової оболонки товстої кишки щурів. Сполучнотканинні прошарки строми між криптами розширені, відмічається збільшення кількості клітин в них. Спостерігається підсилення інфільтрації власної пластинки слизової оболонки лімфоцитами. У підслизовій основі збільшуються розміри і кількість лімфатичних фолікул. Слизова оболонка товстої кишки зазнає дистрофічних змін. Це виявляється у зменшенні товщини слизової оболонки і глибини кишкових крипт. Ці параметри зменшуються вірогідно порівняно з контролем на 17% та 13% відповідно (рис.1). Відбувається значне зниження слизоутворення у епітеліальному шарі, оскільки площа поперечного перерізу келихоподібних клітин вірогідно знижується на 38% та суттєво зменшується їх кількість. Висота епітеліоцитів та площа їх ядер зменшуються на 15% та 25% відповідно (рис.2), що свідчить про пригнічення функціональної активності цих клітин. Оксидативний стрес також викликає пригнічення проліферативної активності епітеліоцитів. Мітотичний індекс знижується порівняно з контролем на 32% (рис. 3).

За умов дії MI-1 на фоні оксидативного стресу стан слизової оболонки дещо покращується, хоча спостерігається підсилення інфільтрації власної пластинки слизової оболонки лімфоцитами, розширюються сполучнотканинні прошарки строми між криптами та збільшується кількість клітинних елементів в них. Глибина крипт достовірно не змінюється, проте слизова оболонка витоншується на 17% (рис. 1). Площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів зменшується на 27%, а висота епітеліоцитів знижується на 14,5% (рис. 2). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин залишається на рівні індивідуального впливу хлориду кобальту (менша контрольних значень на 38%), проте їх кількість не змінюється порівняно з контролем (рис. 2). Сумісна дія обох чинників MI-1 та хлориду кобальту не впливає на проліферативну активність епітелію слизової оболонки: мітотичний індекс близький до контролю (рис. 3). Судини помірно наповнені кров'ю.

Таким чином, MI-1 за умов оксидативного стресу частково попереджує негативний вплив останнього на морфо-функціональний стан слизової оболонки товстої кишки щурів. Зокрема, MI-1 попереджує пригнічення проліферативної активності, яке відбувається під впливом оксидативного стресу (рис. 3). Крім того, протективна дія MI-1 проявляється і по відношенню до функціональної активності крипт, оскільки їх глибина, хоча і менша, ніж в контролі, однак ці зміни невірні (рис. 1). Однак повноцінного відновлення функціональної активності епітеліоцитів слизової оболонки не відбувається, оскільки показники інших вимірюваних параметрів при сумісній дії обох чинників залишались на рівні індивідуального впливу оксидативного стресу.

Висновки

1. MI-1 не викликає деструктивних змін та пригнічення проліферативної активності клітин епітелію слизової оболонки товстої кишки, але викликає їх функціональне напруження та зменшення утворення слизу в слизовій оболонці.

2. Оксидативний стрес, спричинений хлоридом кобальту, викликає значне порушення структурно-функціонального стану слизової оболонки товстої кишки щурів: зменшення її товщини та глибини кишкових крипт, зниження продукуван-

ня слизу, пригніченням проліферативної та функціональної активності епітеліоцитів.

3. MI-1 за умов оксидативного стресу частково попереджує негативний вплив останнього на морфо-функціональний стан слизової оболонки стінки товстої кишки щурів. Протективна дія MI-1 проявляється по відношенню до функціональної активності крипт слизового шару та проліферативної активності епітелію.

4. Похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон впливає на морфо-функціональний стан слизової оболонки товстої кишки щурів не істотно та покращує його за умов оксидативного стресу. Це свідчить про доцільність досліджень MI-1 з метою створення протипухлинних препаратів.

Література

1. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / Г.Г.Дубініна, С.М.Головач, В.О.Козловський [та ін.] // Журн. орган. та фармацевт. хімії. - 2007. - Т.5, № 1. - С. 39-49.

2. Калиман П.А. Цикл глюкоза-жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта / П.А.Калиман, С.М.Охрименко // Укр. біохімічний журнал. - 2005. - Т.77, № 2. - С. 154-158.

3. Вплив похідного малеїміду на стан печінки щурів при оксидативному стресі, спричиненому введенням хлориду кобальту / О.В.Линчак, В.К.Рибальченко, С.В.Яблонська [та ін.] // Доп. НАН України. - 2010. - № 2. С. 160-163.

4. Пристоплюк В.С. Стан сім'яників щурів під впливом нового похідного малеїміду з антипроліферативною активністю за умов оксидативного стресу / В.С.Пристоплюк, І.В.Харчук, Г.В.Островська // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб.наук.праць. - Київ; Луганськ, 2009. - Випуск 9 (96). - С. 36-43.

5. Харчук І.В. Вивчення нефротоксичності похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / І.В. Харчук // Современные проблемы токсикологии. - 2009. - № 2. - С. 46-49.

6. Харчук І.В. Морфо-функціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду / І.В.Харчук, Н.О.Карпезо, Г.В.Островська [та ін.] // *Современные проблемы токсикологии*. - 2008. - № 1. - С. 61-64.

7. Харчук І.В. Особливості морфо-функціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / І.В.Харчук, Н.О.Карпезо, Г.В.Островська [та ін.] // *Доп. НАН України*. - 2009. - № 10. - С. 185-188.

8. Харчук І.В. Зниження нефротоксичного впливу оксидативного стресу похідним малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діоном / І.В.Харчук, Н.О.Карпезо, О.М.Філінська [та ін.] // *Урологія*. - 2009. - № 1. - С. 27-31.

9. Харчук І.В. Морфологічні зміни у підшлунковій залозі щурів під впливом 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / І.В.Харчук, О.В.Линчак, Н.О.Карпезо [та ін.] // *Современные проблемы токсикологии*. - 2008. - № 4. - С. 16-19.

10. Яблонська С.В. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки / С.В.Яблонська, О.М.Філінська, Г.В.Островська, В.К.Рибальченко // *Укр. біохім. журн.* - 2009. - Т.81, № 3. - С. 83-92.

11. Brownl N. S. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer / N. S.Brown, R.Bicknell // *Breast Cancer Res.* - 2001. V. 5, № 3. - P. 323-327.

12. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity: G.G. Dubinina, Yu. M. Volovenko - 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.

13. Yablonska S. Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic

maleimide derivate / S.Yablonska, O.Lynchak, O.Filinska [e.a.] // *The FEBS Journal "Life's molecular interactions: 34th FEBS Congress"*. - 2009. - V. 276. - P.352.

Резюме

Гебура М.П., Харчук І.В., Рибальченко Т.В. Вплив похідного малеїміду з цитостатичною активністю на стан слизової оболонки товстої кишки щурів за умов оксидативного стресу.

Похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) при 10-денному введенні в дозі 5 мг/кг частково попереджує негативний вплив оксидативного стресу на морфо-функціональний стан слизової оболонки товстої кишки щурів. Протективна дія MI-1 проявляється по відношенню до функціональної активності крипт слизового шару та проліферативної активності епітелію. Це свідчить про доцільність досліджень MI-1 з метою створення протипухлинних препаратів.

Ключові слова: похідне малеїміда, оксидативний стрес, слизова оболонка товстої кишки, щури.

Резюме

Гебура М.П., Харчук І.В., Рибальченко Т.В. Влияние производного малеимида с цитостатической активностью на состояние слизистой оболочки толстой кишки крыс в условиях оксидативного стресса.

Производное малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) при 10-дневном введении в дозе 5 мг/кг частично предотвращает негативное воздействие оксидативного стресса на морфо-функциональное состояние слизистой оболочки толстой кишки крыс. Протективное действие MI-1 проявляется по отношению к функциональной активности крипт слизистого слоя и пролиферативной активности эпителия. Это свидетельствует о целесообразности исследований MI-1 с целью создания противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: производное малеимида, оксидативный стресс, слизистая оболочка толстой кишки, крысы.

Summary

Gebura M.P., Kharchuk I.V., Rybalchenko T.V. The influence of the maleimide derivative with cytostatic activity on rats' large intestine mucous membrane state in the oxidative stress conditions.

The maleimide derivative 1-(4-Cl-benzil)-3-Cl-4-(CF₃-fenilamino)-1H-pyrrole-2,5-dion (MI-1) after 10-days daily administration at a dosage 5 mg/kg partially prevents negative effects of oxidative stress on the rats' large intestine mucous membrane morphofunctional state. The maleimide derivative preventive action has been shown with respect to the functional activity of intestinal crypts and proliferative activity of epithelium. These studies indicate advanced research of the maleimide derivative with purpose to create antitumor drugs.

Key words: maleimide derivative, oxidative stress, large intestine mucous membrane, rats.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.М.Федченко